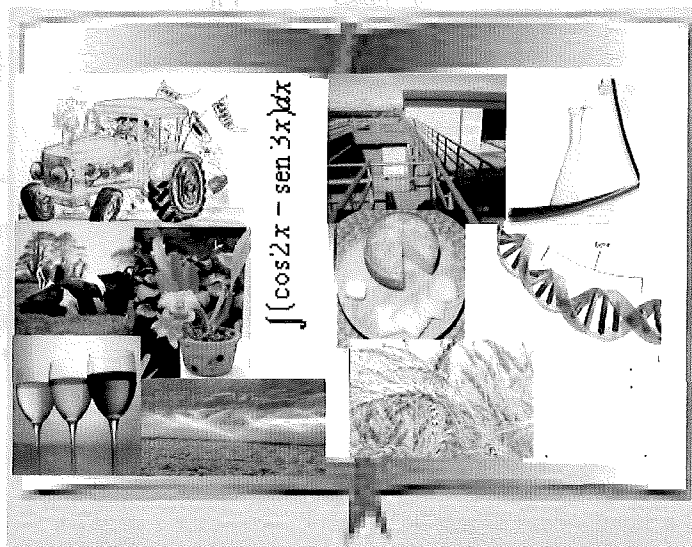


# V CONGRESO DE ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA AGRONÓMICA

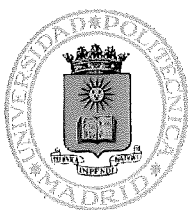


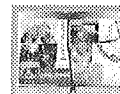
## Libro de Actas

Editado por P.G. Rebollar , A. Gili Pozo y M.A. Pérez-Cabal

8 y 9 de mayo de 2012

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS  
Universidad Politécnica de Madrid





## CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ENDOSIMBIÓTICAS DE *CYTISUS TRIFLORUS*, UNA LEGUMINOSA ÚTIL PARA LA RESTAURACIÓN DE SUELOS EN EL NORTE DE ÁFRICA

Hadjira, Ahnia <sup>1</sup>; Djenadi, Katia <sup>1</sup>; Duran, David <sup>2</sup>

Tutores: Boulila, Abdelghani <sup>1</sup>; Rey, Luis <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Microbiana, F. de Biología, Universidad Mira Abderrahmane, Bejaia, 06000. Argelia.

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología, E.T.S. Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, s/n 28040 Madrid

Correo electrónico: djola.anna@hotmail.fr; djenadikatia@yahoo.fr; david.duran.wendt@alumnos.upm.es

### RESUMEN

La restauración de suelos degradados y pobres del norte de África puede producirse gracias al crecimiento espontáneo de leguminosas arbustivas como *Cytisus triflorus* L'Herit. Parte del éxito de esta planta se debe a que es capaz de formar nódulos en sus raíces ocupados por bacterias denominadas rizobios que aportan dinitrógeno atmosférico fijado a la planta a cambio de fotosintatos. En este trabajo se presenta la caracterización de 37 rizobios aislados de *C. triflorus* en el norte de Argelia. Se indica morfología y color de las colonias, tiempo de generación, capacidad de nodulación con distintas plantas hospedadoras y tipos de nódulos que forman.

**Palabras clave:** *Cytisus triflorus*, *Rhizobium*, análisis filogenético

### INTRODUCCIÓN

Las leguminosas juegan un papel ecológico importante gracias a su capacidad para establecer relaciones simbióticas con bacterias del suelo, denominadas rizobios, que fijan nitrógeno atmosférico en estructuras radicales especializadas denominadas nódulos (Graham, 2008). Debido a esta habilidad, las legumbres pueden crecer en suelos áridos y deficientes en nitrógeno, actuando como colonizadoras pioneras, favoreciendo la fertilización y previniendo la erosión y desertificación.

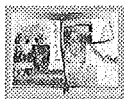
*Cytisus triflorus* (syn. *Cytisus villosus* Pourr) o escobón negro es una leguminosa arbustiva de la tribu *Genisteae* de la familia *Fabaceae* que se extiende en el área mediterránea siendo la especie más abundante del género *Cytisus* en las montañas del centro y norte de Marruecos hasta los montes del Cabo Bon en Túnez.

El estudio de diferentes autores sobre bacterias capaces de nodular especies del género *Cytisus* como *C. scoparius* (L) Link, *C. balansae* Boiss., *C. multiflorus* (L'Her.) Sweet, *C. villosus* y *C. striatus* (Hill) Rothm. ha permitido aislar bacterias de crecimiento lento pertenecientes al género *Bradyrhizobium* (revisado por Chahboune et al, 2011). En este trabajo se muestra la caracterización de 37 aislados de nódulos de *C. triflorus* que crecen en encinares de la región de Bejaia (Norte de Argelia).

### MATÉRIAL Y METODOS

#### Aislamiento de rizobios

Para el aislamiento de las bacterias, los nódulos de *C. triflorus* se desinfectaron en superficie mediante hipoclorito de sodio 3%, aproximadamente 3 minutos y con alcohol 95° durante 5 minutos después, se lavaron 10 veces con agua destilada estéril. A continuación los nódulos se aplastaron en tubos estériles de 1,5 ml utilizando una varilla de metal en condiciones asépticas. Parte del material se extendió sobre una placa de



medio de YMB (agar-levadura-manitol) mediante la técnica de zig-zag con un asa de siembra. Después de 10 días de incubación a 28°C, las colonias bacterianas fueron seleccionados por sus características morfológicas y purificadas varias veces en YMB. Los clones individuales se almacenaron a largo plazo a 80° C en 20% (w/v) glicerol.

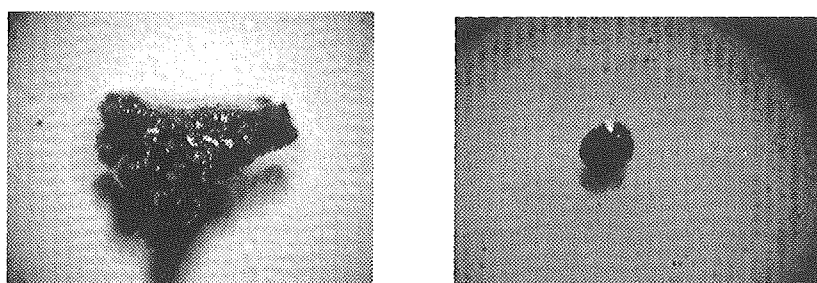
### Ensayo de inoculación cruzada

Todos los aislamientos se inocularon sobre semillas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp que es una leguminosa de amplio rango de nodulación para confirmar su capacidad de formar nódulos y con otros géneros de la tribue *Genisteae* (*Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthel., *Retama sphaerocarpa* L., *Genista numidica* Spach. y *Lupinus albus* L.). Las semillas se desinfectaron superficialmente en ácido sulfúrico concentrado para *Genista* y *Retama*, y en 3% de hipoclorito sódico para las semillas de *Lupinus*. Después se realizaron diez lavados con agua destilada estéril, a continuación se colocaron en placas de agar, y se germinaron en la oscuridad a 20°C (Mahdhi et al., 2007). Tras siete días, cada plántula fue transferida a un sistema Leonard con medio líquido Jensen y fueron inoculadas con 5 ml de suspensión de los aislados ( $10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) por triplicado (Boulila et al., 2009). Tres tratamientos no inoculados se incluyeron como control. La aparición y recuento de nódulos se examinó entre 3-4 semanas después de la inoculación dependiendo del porte de las plantas.

## RÉSULTADOS Y DISCUSIÓN

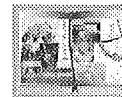
Se recolectaron 27 nódulos de *Cytisus triflorus* silvestres que presentaban formas diferentes, desde simples a multilobulados y de esféricos a alargados (Figura 1). A partir de dichos nódulos se obtuvieron 37 aislados, Gram negativos, también con caracteres fenotípicos diversos (color, tiempo de generación y forma de las colonias).

**Figura 1. Nódulos recolectados de *Cytisus triflorus*** (Fuente: elaboración propia)

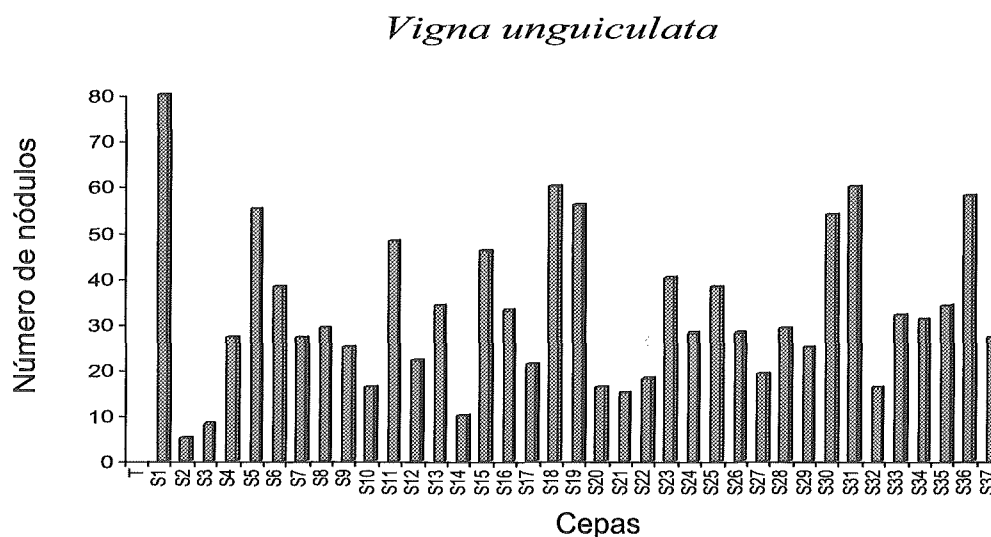


El tiempo en el que aparacieron las colonias en YMB permitió distinguir dos grupos: las que se forman en dos días y las que lo hacen después de 7.

Con objeto de comprobar si los aislados eran capaces de producir nódulos se probaron con plantas de *Vigna unguiculata*, planta nodulada por numerosas especies de rizobios, obteniéndose, en todos los casos, nódulos de diversos tipos. El número de nódulos generado por los 37 aislados varió y se recoge en la Figura 2. Una muestra de los tipos de nódulos obtenidos se muestra en la Figura 3.



**Figura 2. Recuento de nódulos generados por los aislados de *C. triflorus* inoculados sobre *Vigna unguiculata*.**



Recientemente varios aislados de nódulos de *C. triflorus* se han descrito en la región este y central del Rif marroquí (Chahboune et al., 2011). Estos aislados son bradyrizobios, es decir de crecimiento lento y pertenecen a las especies *Bradyrhizobium canariense*, *B. japonicum* y otros *Bradyrhizobium* sin especificar. En estos momentos se está evaluando su similitud con las bacterias aisladas en este trabajo mediante secuenciación de genes básicos 16S rRNA, *recA*, *glnII* y otros relacionados con la simbiosis como *nodC* siguiendo la metodología descrita en Sánchez-Cañizares et al. (2011).

## CONCLUSIONES

Se presenta la caracterización inicial de 37 cepas aisladas de la leguminosa arbustiva *Cytisus triflorus*, planta de interés en la restauración de suelos en el norte de África.

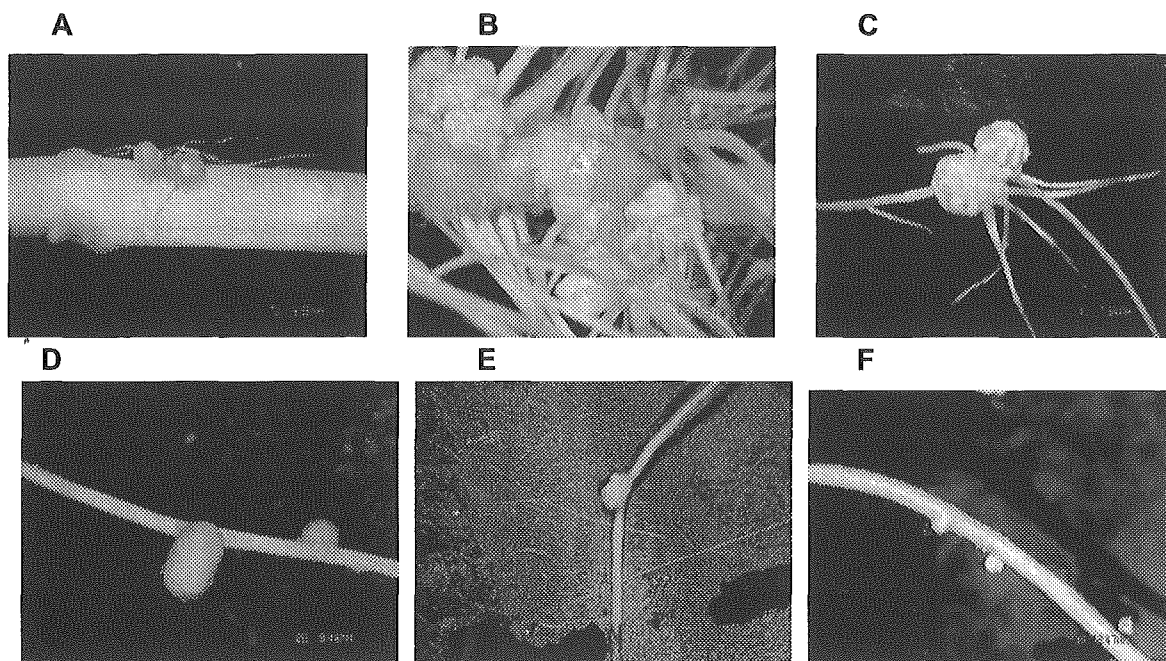
Los endosimbiontes aislados muestran una gran diversidad respecto a su velocidad de crecimiento en placa (medio YMB), color y respecto al número de nódulos que producen con *Vigna unguiculata*.

Dos de los endosimbiontes aislados, de crecimiento lento, son capaces de nodular otras leguminosas de la tribu *Genisteae*: *Retama sphaerocarpa*, *Genista numidica* y *Lupinus albus*. Sin embargo, estos aislados no nodularon *Retama raetam*.

El siguiente paso es la caracterización genotípica de los aislados de este trabajo por técnicas de PCR-RAPD y mediante la secuenciación de genes básicos (housekeeping) y de genes de nodulación con objeto de establecer su posición filogenética entre los rizobios.



**Figura 3. Aspecto de los nódulos generados por los aislados de *C. triflorus* inoculados sobre *Vigna unguiculata* (A, B y C) y sobre *Genista numidica*, *Lupinus albus*, y *Retama sphaerocarpa* respectivamente (D,E y F). (Fuente: elaboración propia)**



#### AGRADECIMIENTOS

A los profesores Farida Boulila (Universidad Mira Abderrahmane de Bejaia) y Tomás Ruiz Argüeso (Universidad Politécnica de Madrid) por su consejo y sugerencias.

#### BIBLIOGRAFIA

- Boulila F., Depret G., Boulila A., Belhadi D., Benallaoua S., Laguerre, G. 2009. Systematic and Applied Microbiology. 32, 245–255.
- Chahboune R., Barrijal S., Moreno S., Bedmar E., 2011. Systematic and Applied Microbiology 34, 440– 445.
- Graham, P.H. 2008 In: Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I., Newton, W.E. (Eds.), Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 23–43.
- Mahdhi M., Nzoue A., Gueye F., Merabet C., de Lajudie P., Mars M. 2007. Letters in Applied Microbiology. 45,604–609.
- Sánchez-Cañizares C., Rey L., Duran D., Temprano F., Sánchez- Jiménez P., Navarro A., Polajnar M., Imperial J., Ruiz-Argüeso T. 2011. Syst Appl Microbiol 34, 207-215.